

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA
CAMPOS UNAM-UAQ. JURIQUILLA. QRO.

5

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE TOXINAS
EXTRAIDAS DE CARACOLES MARINOS DEL
GENERO *Conus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGIA)
P R E S E N T A :
BIOL. JOSE ESTUARDO LOPEZ VERA

JURIQUILLA, QUERETARO

2000

281539



Universidad Nacional
Autónoma de México

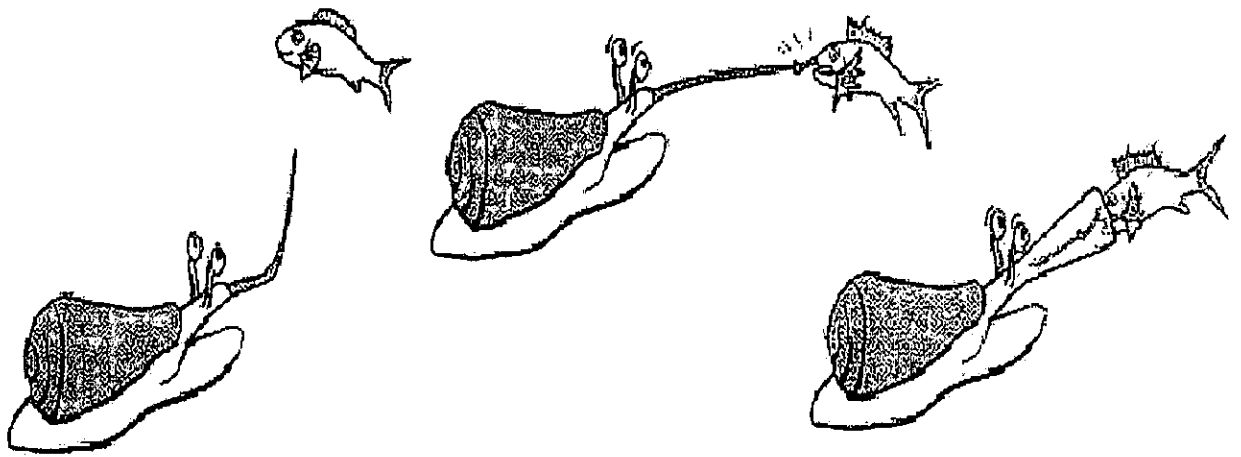


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Para unos, la ciencia es una sublime diosa, para otros, una vaca que suministra excelente mantequilla.

Friedrich Von Schiller Xenien (1796)



PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE TOXINAS EXTRAIDAS DE
CARACOLES MARINOS DEL GENERO *Conus*

José Estuardo López Vera

Centro de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México

Tesis que presenta el Biólogo José Estuardo López Vera, como un requisito para obtener el grado
de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Campus Juriquilla, Querétaro. Julio de 2000



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

CAMPUS UNAM-UAQ JURQUILLA APDO. POSTAL 1-1141 QUERETARO, QRO. 76001

TELS.: (525) 623-40-16 Y 17, FAX: 623-40-17

Los miembros del Comité de Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: José Estuardo López Vera, cuyo titulo es: "Purificación y caracterización de toxinas extraídas de caracoles marinos del Género *Comus*" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Secretario Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Vocal Dr. Edgar Philip Heimer de la Cotera

Suplente Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

Suplente Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Coordinadora de Posgrado

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de los Dres. Edgar P. Heimer de la Coterá y Manuel Aguilar Ramírez, en el laboratorio de Farmacología Marina del Centro de Neurobiología, UNAM.

El alumno tuvo beca para estudios de Maestría otorgada por el CONACYT, por el período febrero/1998 a enero/2000 y una beca complementaria de la Dirección General de Estudios de Posgrado de febrero/1998 a enero/ 2000.

RESUMEN

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE TOXINAS EXTRAIDAS DE CARACOLES MARINOS DEL GENERO *Conus*

Una de las herramientas moleculares más empleadas en los últimos años para el estudio de subtipos de receptores y/o canales iónicos, ha sido el uso de péptidos aislados de caracoles marinos pertenecientes al Género *Conus*. Estos péptidos son moléculas pequeñas formadas por 10 a 30 aminoácidos y que poseen una conformación muy rígida. Muchos forman puentes disulfuro intramoleculares por la característica de presentar residuos de cisteínas en su estructura primaria (Olivera, 1997). Esta característica ha permitido a su vez clasificarlos dentro de clases estructurales, por ejemplo: las α -conotoxinas, cuyas moléculas blanco son los canales de sodio sensibles a voltaje de músculo esquelético, y las ω -conotoxinas, las cuales bloquean el canal de sodio sensible a voltaje en las terminaciones sinápticas, entre otras (Myers et al., 1993). Se han demostrado modificaciones postraduccionales que confieren la formación de α -hélices inusuales que a su vez le dan rigidez y forma a las moléculas. (McIntosh et al., 1984; Olivera 1990).

Mucho de lo que se sabe de las conotoxinas se debe a estudios realizados de caracoles cazadores de peces y mucho menos se sabe de aquellos que se alimentan de otra manera. Los resultados establecidos hasta ahora demuestran que los venenos son una mezcla compleja de péptidos, con las mismas clases estructurales. En lo que se refiere a caracoles cazadores de gusanos o de moluscos, algunas secuencias peptídicas han sido encontradas, tales como los péptidos KK-O (Woodward et al., 1990) y QCVIA (Olivera et al., 1990), los cuales pertenecen a la misma clase estructural de las ω -conotoxinas de caracoles cazadores de peces, la cual presenta 4 puentes disulfuro debido al patrón de residuos de cisteína.

En este trabajo reportamos la purificación y caracterización completa de dos péptidos aislados del caracol cazador de gusanos *Conus delessertii* y la purificación parcial de un péptido aislado del caracol *Conus spurius*. Ambas especies fueron colectadas en el Mar Caribe mexicano. Uno de los péptidos tiene ocho residuos de cisteína y modificaciones postraduccionales nunca antes descritas, tal como la hidroxilación del aminoácido lisina. Este péptido podría representar una nueva clase estructural.

SUMMARY

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TOXINS ISOLATED FROM MARINE SNAILS BELONGING TO THE GENUS *Conus*.

One of the molecular tools most widely used in recent years to study subtypes of receptors or ion channels has been peptides isolated from hunting cone snails, belonging to the genus *Conus*. These peptides are small molecules between 10-30 amino acids in length, and are invariably highly constrained in conformation. Most are cross-linked through multiple intramolecular disulfide linkages by the characteristic arrangement of cysteine residues in their structure (Olivera 1997). This characteristic has permitted them to be classified into a few structural classes, for example, α -conotoxins, which target skeletal muscle sodium channels at the tetrodotoxin/saxitoxin site, and ω -conotoxins, which block voltage-sensitive calcium channels at presynaptic termini (Myers et al., 1993). Furthermore, other conformation-constraining strategies have been discovered, such as the presence of an unusual α -helix posttranslational modification (McIntosh et al., 1984, Olivera et al., 1990).

Although most of the generalizations about conotoxins and other *Conus* peptides are derived primarily from studies of fish-hunting species, much less work has been done on *Conus* species of other feeding types. However, the results to date establish that their venoms are also complex mixtures of peptides, with the same major structural classes. In the mollusk-hunting and worm-hunting species, several peptide sequences have been found, such as KK-O (Woodward et al., 1990) and peptide QCVIA (Olivera et al., 1990), which belong to the same structural class as the ω -conotoxins from fish-hunting cones since they possess a 4-loop cysteine framework.

In this work, we describe the complete purification and biochemical characterization of two novel peptides from the worm-hunting snail *Conus delessertii*, and the partial purification of one peptide from the snail *Conus spurius*, collected in the Mexican Caribbean. One of the peptides from *C. delessertii* has eight cysteine residues and post-translational modifications of the amino acid lysine, never before described in conotoxins. This new peptide may represent a new structural class of conotoxins.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer de manera muy especial a mi tutor, Dr. Edgar P. Heimer de la Coterá, por su apoyo y paciencia en la realización de este trabajo, por confiar en mí y sobre todo por ser mi amigo.

Deseo agradecer también al Dr. Manuel Aguilar Ramírez, por compartir su experiencia tanto dentro como fuera del laboratorio, por ser mi más arduo crítico en la realización de este escrito y por ser igualmente mi tutor.

Al Dr. Baldomero Olivera, quien me apoyó incondicionalmente y me abrió las puertas de su laboratorio en la Universidad de Utah, EUA.

A Marcelina B. Lirazan (Lita) por haberme instruido en las técnicas de purificación de toxinas de caracoles marinos.

A la Bióloga María Eugenia Ramos Aguilar, por la captura de los organismos que fueron parte fundamental en la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial. Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Manuel Aguilar Ramírez y Dr. Rogelio Arellano Ostoa por sus sugerencias y comentarios a lo largo de este trabajo.

A los miembros del jurado, Dr. Lourival Possani Postay, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, Dr. Edgar P. Heimer de la Coterá y Mauricio Díaz Muñoz, por sus comentarios y correcciones que enriquecieron este trabajo.

DEDICATORIAS

A toda mi familia, especialmente a mis padres Ing. Estuardo López Martínez y Profra. Ma. Elvira Vera Frutos por seguir permitiendo que siga estudiando

A la diseñadora de la familia Sandra Luz López Vera

A mis abuelos Amalia Frutos Jiménez†, Armando López Martínez† y Regina Martínez Vázquez

A mi mamamama Profra. Luz María Frutos Jiménez†

A mis tíos y tías Esperanza Vera, Anita Frutos, Armando López, Edith Esquivel y Bernardo Tarango por estar siempre al pendiente de mi

A la Química María Maillo Peñalver por todas las peripecias por las que hemos pasado y por considerarme como un amigo

A todos mis compañeros del laboratorio, Andrés, Víctor, Mónica, Claudia , Luz María, Lenin y Heriberto

A los cuates del Centro de Neurobiología Hector, Pavel, Alejandra, Eileen, Rafa, Toño, Ariel, Gaby, Luis y Daniel Reyes Haro

A Ana Cecilia Cepeda Nieto por aguantarme y brindarme su cariño durante este tiempo

A los compañeros de generación Carmen, Ivett, Daniel y Enrique , esperando que pronto estén en las mismas

A los cuates de siempre Malco, Andrés, Eduardo y Pablo

INDICE

Resumen en español _____	IV
Resumen en inglés _____	V
Introducción _____	1
Caracoles _____	2
Componentes bioactivos de origen marino _____	5
Familias de toxinas de caracoles marinos _____	7
Mecanismos de acción de las conotoxinas _____	12
OBJETIVOS _____	15
MATERIAL y METODOS	
Obtención de especímenes _____	16
Aislamiento de los conductos venenosos _____	16
Extracción del veneno _____	17

Separación y purificación de los componentes del veneno _____	17
Repurificación de los péptidos _____	18
Análisis de la estructura primaria _____	18
Espectrometría de masas _____	18
Reducción y alquilación de los péptidos _____	19
Digestión de los péptidos con endopeptidasas _____	19
RESULTADOS	
Identificación de los organismos _____	20
Purificación y caracterización de las toxinas de la especie <i>C. delessertii</i> ____	21
Secuencia de aminoácidos de los picos A, B y espectrometría de masas ____	21
Determinación de residuos de aminoácidos y puentes disulfuro _____	22
Purificación y caracterización de las toxinas de la especie <i>C. spurius</i> _____	23
DISCUSION Y CONCLUSIONES _____	33
BIBLIOGRAFIA _____	39

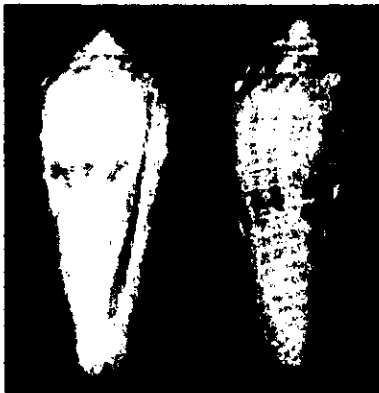
INTRODUCCION

Las costas del litoral mexicano que van desde la frontera norte hasta Quintana Roo, albergan una amplia diversidad de fauna y flora, aunada con una complejidad en ambientes. En ellos confluyen organismos dulceacuícolas y marinos. Su estudio ha sido preocupación creciente de instituciones académicas y técnicas, así como de numerosos investigadores nacionales y extranjeros, que han reconocido en ellas una fuente de recursos no bien explotados y mucho menos bien conocidos; es por ello que el estudio sistemático de la flora y fauna, desde cualquier punto de vista de las áreas biológicas, beneficiará directamente a millones de personas.

De lo antedicho surge, en parte, el interés por la búsqueda de nuevos fármacos de origen natural, en especial los extraídos de caracoles marinos; los venenos que contienen éstos han sido utilizados por varios laboratorios de investigación en una gran variedad de investigaciones fisiológicas y farmacológicas a nivel del sistema nervioso tanto en organismos vertebrados como en invertebrados. Es muy posible que cada péptido aislado de caracoles del género *Conus* sirva de ligando para un receptor específico de la membrana plasmática (Myers et al., 1993).

Por ello, podemos decir sin lugar a dudas que el inicio de estudios enfocados a determinar la actividad biológica y/o caracterización de péptidos neurotóxicos de venenos provenientes de invertebrados marinos (gasterópodos) abrirá un nuevo campo de investigación en nuestro país.

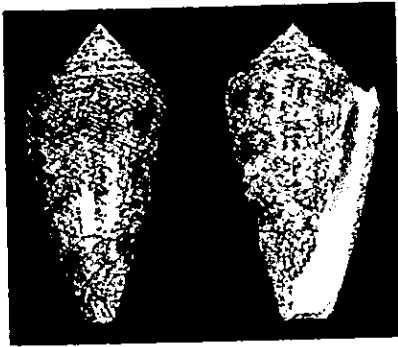
Los caracoles marinos, específicamente los conos son animales pertenecientes al *Phylum* Mollusca y a la clase *Gastropoda*, los cuales son muy atractivos debido a la forma, brillo y color de su concha (figura 1). Cuando en su radio de acción aparece una víctima, alarga su trompa y dispara una estructura semejante a un arpón conocida como rádula (figura 2), la cual clava en la carne de su presa, a la que inmoviliza debido a los efectos del veneno que le inyecta. Por ejemplo, la toxina del *Conus geographus* es un relajante muscular poderoso; los animales víctimas de esta especie se distienden tanto que dejan de respirar y mueren. Por el contrario, la especie *Conus magus* inmoviliza a sus víctimas merced a una sustancia que provoca una potente contracción muscular. Estas toxinas pudieran, por lo tanto, usarse en medicina como estimulante o relajante muscular.



a



b



c



d

Figura 1 Conchas de algunas especies de *Conus*, de las cuales su veneno ha sido aislado. a) *Conus granulatus* b) *C. purpurascens* c) *C. gloriamaris* d) *C. geographus*

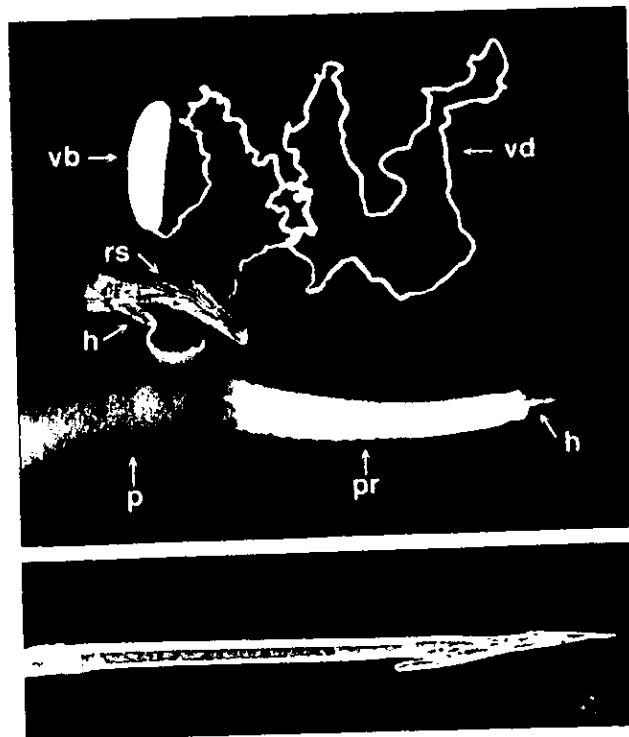


Figura 2. En la imagen superior , se representa el aparato venenoso de *C. purpurascens*. vb, bulbo venenoso, vd, conducto venenoso, rs, saco radular ; h, dientes como arpones ; p, faringe; pr, proboscis. La imagen inferior, es una acercamiento a través de microscopía electrónica del diente en forma de arpón (rádula).

Los caracoles marinos del género *Conus* son uno de los grupos de animales marinos vivientes con mayor éxito hoy en día y se conocen alrededor de 500 especies (Kohn, 1976; Röckel et al., 1995). Cada especie es un especialista en neurofarmacología debido a que su veneno es utilizado de diferentes maneras, ya sea para capturar a su presa, o para escape y defensa de su depredador.

Sin embargo cada especie está altamente especializada respecto a su presa ; probablemente el grupo más grande sea aquel que se alimenta de gusanos poliquetos y lo conforman alrededor de más de 150 especies, secundándole aquel grupo que se alimenta de peces (ca 70) y otro, con alrededor de 70 especies especializado en moluscos.

En particular estamos interesados en las especies *Conus delessertii* y *Conus spurius* debido a que son unas de las especies reportadas para el país, lo que facilita su captura, así como el hecho de que no existen estudios bioquímicos acerca de los componentes de sus venenos. Su distribución abarca todo lo que es el Golfo de México (de los arrecifes de Carolina al sur de la Florida hasta la península de Yucatán). La especie *C. delessertii* mide entre 5 a 8 centímetros en longitud, presenta de 10 a 12 espirales en la parte inferior de la concha; se le encuentra a grandes profundidades.

El *C. Spurius*, es una especie común que alcanza medidas hasta de 12 centímetros en longitud y se encuentra en aguas poco profundas; el color de la apertura es blanco.

La coloración para ambos es como se muestra en la figura 3, viéndose para el primero dos bandas blancuzcas que le confiere su especificidad mientras que

para el segundo el patrón del color café en pequeños recuadros a lo largo de la concha es lo que le confiere su identidad.

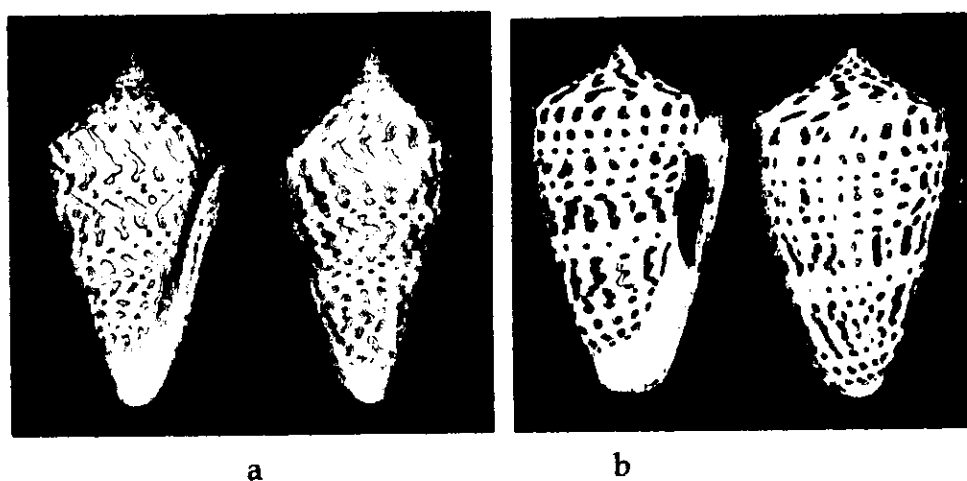


Figura 3. a) *C. delessertii*, b) *C. spurius*

COMPONENTES BIOACTIVOS DE ORIGEN MARINO

La literatura que trata sobre productos naturales de origen marino está enfocada principalmente a la caracterización de compuestos con actividad citotóxica como modelo para la actividad antineoplásica (de Vries y Beart, 1995). Sin embargo, también están reportadas otras actividades biológicas y farmacológicas para este tipo de compuestos, por ejemplo, agentes antibióticos (Ridwan et al., 1995), antiinflamatorios (Konig y Wright, 1996), antivirales (de Vries y Beart, 1995; Konig y Wright, 1996), analgésicos (Konig y Wright, 1996),

para el segundo el patrón del color café en pequeños recuadros a lo largo de la concha es lo que le confiere su identidad.

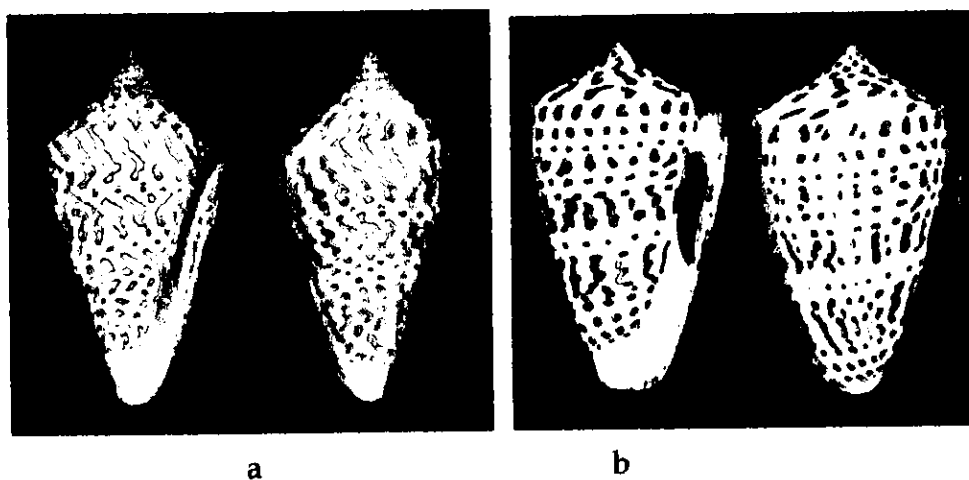


Figura 3. a) *C. delessertii*, b) *C. spurius*

COMPONENTES BIOACTIVOS DE ORIGEN MARINO

La literatura que trata sobre productos naturales de origen marino está enfocada principalmente a la caracterización de compuestos con actividad citotóxica como modelo para la actividad antineoplásica (de Vries y Beart, 1995). Sin embargo, también están reportadas otras actividades biológicas y farmacológicas para este tipo de compuestos, por ejemplo, agentes antibióticos (Ridwan et al., 1995), antiinflamatorios (Konig y Wright, 1996), antivirales (de Vries y Beart, 1995; Konig y Wright, 1996), analgésicos (Konig y Wright, 1996),

cardiotóxicos (Burnett, 1990), y agentes con actividad hemolítica (Othman y Burnett, 1990; Rottini et al., 1995; Burnett et al., 1990; Burnett, 1995) entre otros.

Los organismos marinos del *Phyllum* Cnidaria, en el que se incluyen anémonas y medusas, poseen toxinas que bloquean canales iónicos localizados en la membrana plasmática. Para el caso de las anémonas, los péptidos neurotóxicos son aproximadamente de 40 a 100 aminoácidos (Kem et al., 1990) y se ha visto que tienen una actividad inhibitoria tanto en canales de K^+ , por ejemplo: un péptido constituido por 37 aminoácidos (BgK), aislado de la anémona *Bunodosoma granulífera* (Dauplais et al., 1997; Cotton et al., 1997), como en canales de Na^+ (bloqueados por la Toxina II, aislada de *Anemonia sulcata*). En lo concerniente a medusas, dentro de las actividades biológicas que presentan, se encuentra el efecto del veneno de *Chrysaora sp* sobre canales catiónicos permeables a Na^+ , K^+ , Cs^+ y Li^+ , en tejido neuronal (Dubois, Tanguy y Burnett, 1983).

Del *Phyllum* Mollusca sobresalen por su potencial y diversidad los gasterópodos del género *Conus sp*; de éstos han sido aisladas diferentes neurotoxinas, usadas como herramientas para una amplia variedad de investigaciones fisiológicas sobre el sistema nervioso, tanto de vertebrados como de invertebrados (Gray, Olivera y Cruz 1988; Olivera et al., 1994) debido a que los blancos biológicos de estas toxinas son canales iónicos y receptores (Olivera et al., 1990; Myers, Cruz, Rivier y Olivera 1993; Shon, Hasson, Spira, Cruz, Gray y Olivera, 1994). Más de 50 péptidos de *Conus sp*, biológicamente activos, han sido aislados y secuenciados hasta la fecha (Olivera, et al., 1995).

El veneno de cada caracol está constituido por alrededor de 50 a 200 péptidos diferentes entre sí y con la característica de ser biológicamente activos; muchos de estos péptidos están formados de 6 a 40 aminoácidos, pero la mayoría contiene de 12 a 30 aminoácidos (Olivera et al., 1990).

FAMILIAS DE TOXINAS DE CARACOLES MARINOS

A las toxinas biológicamente activas del género *Conus* se les llama conotoxinas o conopéptidos. Están constituidas por péptidos pequeños altamente plegados ya que contienen varios residuos de cisteínas a lo largo de su estructura primaria, lo que les permite la formación de enlaces disulfuro intramoleculares (Cruz, 1989; Myers, Cruz y Olivera 1993). A estos péptidos se les ha agrupado en diferentes familias farmacológicas (Tabla I) ya que sus proteínas blanco son diversos receptores y canales del sistema nervioso y neuromuscular como son: receptores nicotínicos de acetilcolina (Martínez et al., 1995), canales de calcio y sodio sensibles a voltaje (Gray et al., 1988; Cruz, 1989; Faizilber et al., 1996) y receptores de glutamato sensibles a N-metil-D-aspartato. (NMDA) (Olivera et al., 1990; Lin et al., 1997; Haack et al., 1990). Asimismo estas conotoxinas forman clases estructurales las cuales están definidas por el patrón en la posición de los residuos de cisteínas en su arreglo estructural o por la modificación postraduccional del aminoácido γ - carboxiglutamato (Olivera et al., 1990; Olivera et al., 1996). Tanto el arreglo en la posición de las cisteínas como el γ - carboxiglutamato le confieren una conformación rígida al péptido, ya que los residuos de cisteínas tiene la capacidad de formar puentes disulfuro, mientras que el γ - carboxiglutamato tiene la capacidad de estabilizar las regiones α - hélices en presencia de Ca^{2+} (Tabla 2).

Debido a su pequeño tamaño, estas moléculas pueden ser analizada por técnicas multidimensionales NMR para definir la superficie complementaria de unión con la proteína blanco e invariablemente el sitio funcional de este receptor.

Al parecer, solamente existen pocas clases estructurales en todos los péptidos extraídos de varias especies de *Conus*. Sin embargo una clase estructural incluye múltiples familias farmacológicas de péptidos; más del 30% de los

péptidos secuenciados pertenecen a una simple clase estructural definida por el arreglo en los residuos de cisteínas en las ω -conotoxinas (C-C-CC-C-C).

Los miembros de una clase estructural de conotoxinas también comparten homología en la secuencia del péptido precursor; este prepropéptido posee un alto grado de identidad en la secuencia señal y una fuerte homología en la región pre (Figura 4). Además los miembros pertenecientes a una familia farmacológica presentan una mayor homología en la secuencia del precursor que los pertenecientes a otra familia farmacológica dentro de la misma clase estructural. Y por si fuera poco, los Conus pueden involucrar un sinnúmero de posibles soluciones para la unión en algún sitio en particular de un ligando específico, como lo hace la ω -conotoxina que inhibe canales de calcio sensibles a voltaje.

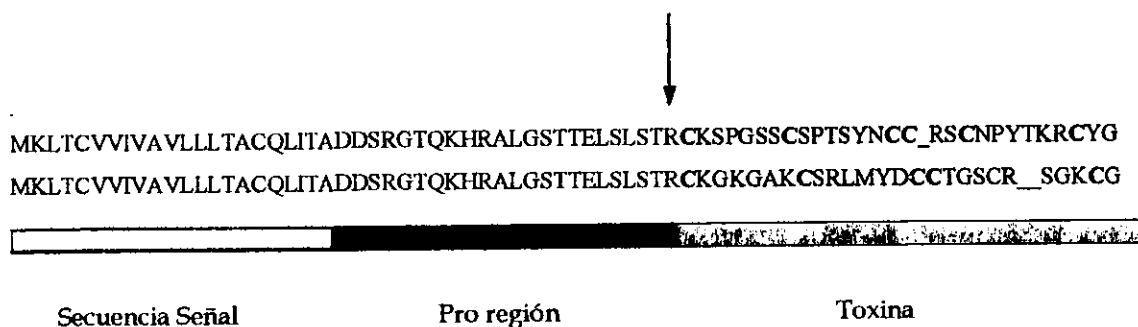


Figura 4. Comparación de las secuencias del precursor en dos ω -conotoxinas, GVIA (la secuencia de arriba) y MVIA (la secuencia de abajo) provenientes de *Conus geographus* y *Conus magus*, respectivamente. Los aminoácidos en rojo comprenden la secuencia señal, mientras la flecha indica el sitio proteolítico que genera la toxina madura.

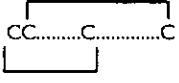
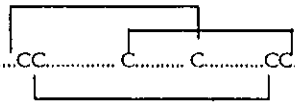
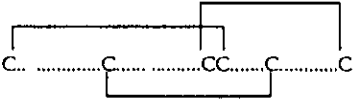
Además, los conopéptidos son traducidos directamente de genes, y sus secuencias de aminoácidos son codificadas directamente de la secuencia del ácido nucléico, a diferencia con muchos productos naturales de origen marino que son compuestos orgánicos muy complejos producidos por la acción de enzimas; esto conlleva a un paso más de información codificada en el ADN de los organismos que debe ser removida. De esta manera, la descodificación directa del ADN puede ser una de las habilidades determinantes en estos caracoles para la generación de estructuras nuevas en un tiempo corto hablando en términos evolutivos.

Si bien muchos de los conopéptidos presentan modificaciones postraduccionales (como amidación del carboxilo terminal, hidroxilación de prolina y lisina, γ -carboxilación de glutamato, entre otras), se ha sugerido que tales modificaciones son preestablecidas en la secuencias de las regiones señal y pro del precursor; por cual, también estas modificaciones podrían ser consideradas como consecuencia de traducción genética.

Tabla I. Proteínas blanco conocidas de conopéptidos

Clase de conopéptido	Proteína blanco	Subtipo	Ejemplo de conopéptido	Referencia
α -conotoxina	Receptor nicotínico de acetilcolina	Unión neuromuscular	GI SI	Gray et al.,1984
μ - conotoxina	Canales de sodio sensibles a voltaje	Músculo esquelético	GIII	Cruz et al., 1985
ω -conotoxina	Canales de calcio sensibles a voltaje	Neuronal (Tipo-N)	GVIA MVIC	Olivera et al.,1984
Conantokinas	Receptor de glutamato	NMDA	Conantokina-G	Hammerlsand et al.,1992
Conopresinas	Receptor de vasopresina	No determinado	Conopresina-G	Cruz et al.,1987

Tabla II. Secuencias de aminoácidos encontrados en toxinas provenientes de caracoles marinos del género *Conus*

Familia	Péptido	Secuencia	Referencia
α-conotoxina	GI	ECCNPACGRHYSC*	Gray et al.,1981
	GIA	ECCNPACGRHYSC*	Gray et al.,1981
	GII	ECCHPACGKHFSC*	Gray et al.,1981
	MI	GRCCHPACGKNYSC*	McIntosh et al.,1982
	Puentes disulfuros		Gray et el 1984
μ- conotoxina	GIIIA	RDCCTOOKKCKDRQCKOQRCCA	Sato et al., 1983
	GIIIB	RDCCTOORKCKDRRCKOMKCCA	Sato et al., 1983
	GIIIC	RDCCTOOKKCKDRRCKOLKCCA	Cruz et al., 1985
	Puentes disulfuros		Gray et al., 1984
α-conotoxina	GVIA	CKSOGSSCSOTSYNCCR-SCNOYTKRCY	Olivera et al., 1984
	GVIB	CKSOGSSCSOTSYNCCR-SCNOYTKRCY ^G	Olivera et al., 1985
	GVIC	CKSOGSSCSOTSYNCCR-SCNOYTKRC	Olivera et al., 1985
	SVIA	CRSSGSOCGVTSI--CC-GRC- YRGKCT	Ramilo et al., 1992
	SVIB	CKLKGOSCRKTSYDCCSGSGRS-GKC	Ramilo et al., 1992
	Puentes disulfuros		Olivera et al., 1984
Conatokinas	Conatokina - G	GE _γ LQ _γ NQ _γ LIR _γ KSN	McIntosh et al., 1984
	Conatokina - T	GE _γ YQKML _γ NLR _γ AEVKKNA	Haack et al.,1990
Conopresinas	Arg-conopresina-S	CIIRNCPRG	Cruz et al., 1987
	Lys-conopresina-G	CFIRNCPKG	Cruz et al., 1987

MECANISMOS DE ACCION DE LAS CONOTOXINAS

La especificidad en la manera de alimentarse de estos caracoles (piscívoros, molusquívoros y vermívoros) sugiere que está relacionada a la especificidad farmacológica del contenido de sus venenos; así, cada una de estas neurotoxinas actúan sobre canales y/o receptores específicos según su presa y además ejercen una acción sinérgica con otros componentes del veneno para incrementar así la velocidad de acción. Como ejemplo de la actividad de las conotoxinas se ha demostrado para la especie *Conus purpurascens*, dos fases de acción de su veneno para inmovilizar a su presa (figura 5).

La primera fase consiste en un choque excitotóxico seguido por un bloqueo neuromuscular (Terlau et al., 1996). El primer efecto fisiológico, el choque excitotóxico, requiere la acción combinada de un péptido que evita el cierre de canales de sodio dependientes de voltaje una vez abiertos, permitiendo así la entrada de este ion a la célula (Shon et al., 1995), y una segunda toxina que inhibe la salida de potasio a través de ciertos subtipos de canales para este ion (Terlau et al., 1996). La combinación del incremento de sodio hacia el interior de la célula y la disminución de la salida de potasio da como resultado una despolarización de la red neuronal en el sitio de inyección.

La segunda fase consiste en un grupo de péptidos del mismo veneno que actúan de forma sinérgica bloqueando la transmisión neuromuscular. Este bloqueo se da de tres maneras: 1) por un grupo de péptidos los cuales antagonizan diferentes subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje (Olivera et al., 1994) y de este modo se inhibe la liberación del neurotransmisor; 2) por el antagonismo competitivo y no competitivo del receptor de acetilcolina postsináptico (Gray et al., 1984; Shon et al., 1997) que previene la despolarización del músculo; y 3) por el bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje en

músculo esquelético (Spence et al., 1997; Nakamura et al., 1983; Sato et al., 1983; Cruz et al., 1985).

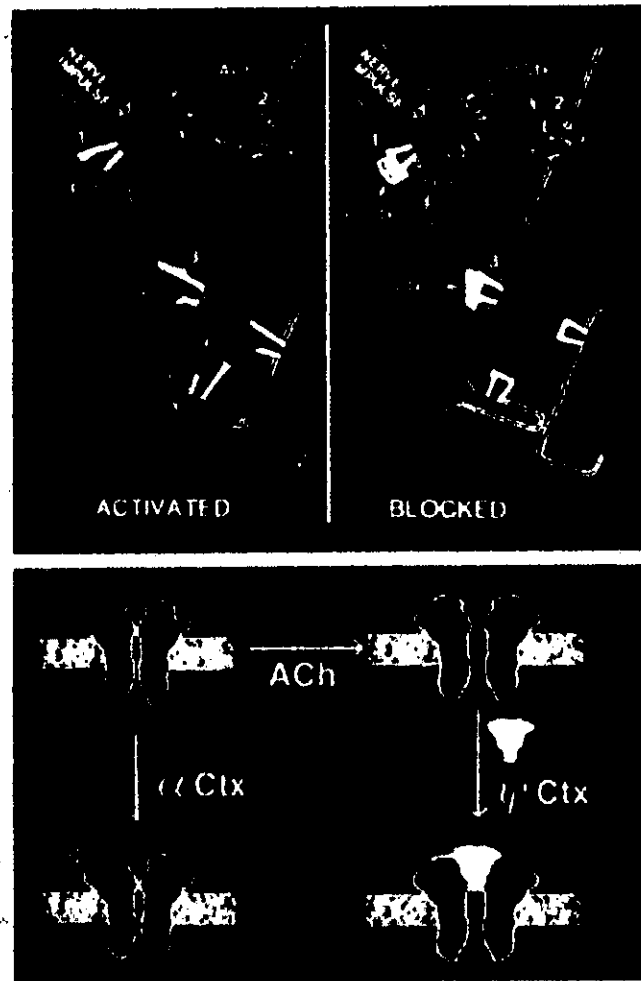


Figura 5. Mecanismo de inhibición en la transmisión neuromuscular
1) canales de Ca^{2+} ; 2) receptores de acetilcolina nicotínicos ; y 3) canales de Na^+
sensibles a voltaje en músculo esquelético

Además, se ha postulado que estos péptidos interactúan con un "macrofitio" en algún receptor en particular o canal iónico. El macrofitio a su vez presenta "microfitios" de unión en el cual la toxina se une, impidiendo de esta manera que se una el ligando en su sitio agonista; y por consecuencia se bloquea la actividad biológica del receptor o canal iónico (figura 6)(Myers, et al., 1993).

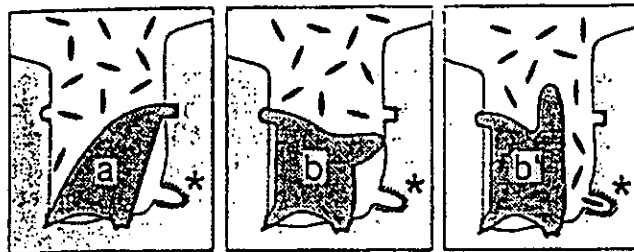


Figura 6. Representación esquemática de la unión de un ligando a su receptor. Las representaciones elípticas representan el ligando natural para este receptor. El sitio de unión para el ligando natural está indicado por el asterisco. Tanto la toxina a como b inhiben el macrofitio y comparten dos micrositios, con un micrositio que es único para cada toxina.

OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tiene como objetivo principal la purificación y caracterización bioquímica de algunos péptidos contenidos en los venenos de las especies *Conus delessertii* y *Conus spurius*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar los ejemplares de caracoles de acuerdo a las características de especificidad reportadas para cada una de estas especies.

Establecer las técnicas de aislamiento (disección, extracción) y purificación (cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa) de péptidos contenidos en este Género de caracoles.

Aplicar la técnica de degradación de péptidos, por el principio de Edman, con la finalidad de obtener la estructura primaria de los péptidos purificados.

Determinar si los péptidos aislados de estas especies pertenecen a alguna familia dentro de las conotoxinas reportadas.

MATERIAL Y METODO

- Obtención de especímenes

Los caracoles tanto de la especie *C. delessertii* como de la especie *C. spurius* se obtuvieron a través de redes camaroneras, en las costas de Quintana Roo. Los animales se mantuvieron en congelación tanto en el recorrido del barco como en la estación marina de Puerto Morelos, Qro., perteneciente al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

Una vez congelados los organismos, se mandaron bajo las mismas condiciones al Laboratorio de la Unidad de Bioquímica Analítica y Neurofarmacología Marina del Centro de Neurobiología de la UNAM, por servicio de mensajería.

- Aislamiento de los conductos venenosos

Los conductos venenosos se aislaron primeramente mediante el quebrantamiento de las conchas y después, con la ayuda de unas pinzas y tijeras se disecaron los conductos venenosos.

Una vez aislados los conductos venenosos se colocaron en un amortiguador de extracción con una composición de 50% (v/v) de Acetonitrilo (ACN) y 0.5% (v/v) de Acido trifluoroacético (TFA).

- Extracción del veneno

La extracción del veneno se realizó mediante la homogeneización de los conductos venenosos, siendo el número de estos variables (ver resultados) en 5ml de amortiguador de extracción a 4°C, utilizando un homogeneizador Brinkmann Politron (Modelo PT 10/35). Una vez obtenido el homogeneizado éste se centrifugó a 17,000g por 30 minutos. El sedimento se desechó y el sobrenadante se conservó como la fracción que contiene los péptidos.

- Separación y purificación de los componentes del veneno

Los péptidos que constituyen el veneno de estas especies se separaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC Bio-Rad, Modelo 2800) en fase reversa, con la utilización de una columna analítica Vydac C18 (218TP54, 4.6 x 250 mm; 300 Amstrongs tamaño de poro), con una precolumna Vydac (218gk54, 5µ. 0.46 x 1.0 cm).

Los péptidos se eluyeron a temperatura ambiente y bajo un gradiente que va de 5% de amortiguador A a 90% de amortiguador B, cuyos contenidos son 0.1% de TFA y 90% de ACN + 0.085% de TFA respectivamente, con un incremento de 1% de B por minuto y la detección fue realizada con un espectrofotómetro de flujo ajustado a 220nm de longitud de onda.

- Repurificación de los péptidos

La repurificación se realizó mediante la recromatografía del material obtenido en la elución previa, tomando en cuenta el tiempo de retención para dicho material ya que a partir de ese tiempo se corrió un gradiente de separación que va de 5% menor y 5% mayor a su tiempo de retención aparente con un gradiente de 1% ACN por tres minutos.

- Análisis de la estructura primaria

Cada uno de los péptidos purificados (10pmol aproximadamente) fueron analizados mediante la utilización de un secuenciador automático de proteínas bajo el principio de degradación de Edman (Procise 491 Applied Systems). Se usó el método Pulse-liquid, modificado para optimizar la separación de los derivados PTH-lis y PTH- Leu.

- Espectrometría de masas

Los espectros de iones positivos de las muestras se obtuvieron a través de espectrometría de masas por desorción láser (LDMS), con un espectrómetro de doble foco JEOL JMS HX110, dándonos así, la masa molecular de los péptidos. Los espectros fueron hechos por el Dr. Anthony Craig en el Instituto de estudios biológicos de Salk, en La Jolla, California EUA.

- Reducción y alquilación de los péptidos

Posteriormente a la purificación de los péptidos por HPLC de fase reversa, los péptidos se concentraron a sequedad y se mantuvieron secos en el tubo a -20°C ; para su reducción se les agregó $150\mu\text{l}$ de solución de 5mg/ml de tricloroetilpiridina (TCEP) en 0.17M de citrato pH 3 y se mezcló hasta disolver. Se dejó incubar por 20 minutos a 65°C .

La alquilación se hizo agregando 4-vinilpiridina a una concentración de $3\mu\text{l/ml}$. Se taparon los tubos con papel aluminio con la finalidad de protegerlos de la luz, se mezclaron y se incubaron de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente los péptidos reducidos y alquilados se purificaron por HPLC, equilibrando la columna a un porcentaje de 10% menor del amortiguador B del porcentaje original de péptido eludido.

- Digestión de los péptidos con endopeptidasas.

La digestión de los péptidos se realizó utilizando las endopeptidasas comerciales de Boehringer Mannheim (la Tripsina modificada y la Quimiotripsina grado secuenciación), de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

RESULTADOS

- Identificación de los organismos

La identificación de las especies se realizó de la manera usual, que consistió en revisar los caracteres morfológicos externos que presentan las conchas, con la ayuda del libro titulado *American Sea Shell* (R. Tucker Abbott, 1974) y un microscopio estereoscópico. Para ello se tomó cada una de las conchas de los organismos a los cuales se les extrajo el conducto venenoso.

Las características morfológicas externas que presentaron las conchas fueron las siguientes :

La longitud para la primera especie fue de un promedio de 6 cm ; presentó de 10 a 12 espirales en la parte inferior de la concha y dos bandas de una coloración blancuzca.

Para la otra especie el tamaño promedio fue de 8 cm, coloración blanca con un patrón de manchas en forma de cuadros de color café en una disposición en espiral y el color de la apertura es blanco.

Esto permitió identificar dos especies : *Conus delessertii* para el primer caso y *Conus spurius* para el segundo caso (figura 3).

- Purificación y caracterización de las toxinas de la especie *C. delessertii*

Para esta especie, el veneno crudo fue obtenido de 4 conductos venenosos y fraccionados por HPLC de fase reversa, en una columna analítica Vydac C₁₈ (figura 7). Se observaron un gran número de picos que absorben a 220nm, dos de los cuales en conjunto representan aproximadamente el 15% del total de la absorbencia de la fracción eluida (indicados con las letras A y B en la figura 7). Estos dos grandes componentes fueron repurificados usando la misma columna, como se muestra en la figura 8.

- Secuencia de aminoácidos de los picos A y B, y espectrometría de masas

Los análisis de los feniltiohidantoin-aminoácidos por el principio de degradación de Edman (figura 9:estandar) dieron las secuencias indicadas en la tabla III. La verificación de la secuencia completa fue hecha por el análisis de masas empleando LDMS. La observación de los iones moleculares fue consistente con la secuencia para ambos picos. (ver tabla IV ; figuras 10 y 11). Así, el péptido A tiene 27 residuos de aminoácidos de los cuales 6 son cisteínas que están en la secuencia (C-C-CC-C-C), mientras que el péptido B está constituido por 33 residuos de aminoácidos, 3 de ellos son hidroxilisinas y 8 de ellos son cisteínas en el orden (C-C-C-CC-C-C-C).

- Determinación de residuos de cisteína y puentes disulfuro

Para confirmar los residuos de cisteínas en las secuencias de los péptidos A y B, se redujeron con TCEP a pH 3 y posteriormente se alquilaron con 4-vinilpiridina, a una concentración de 3 μ l/ml. Esto permitió ver los derivados feniltiohidantoin-cisteínas al momento de la secuenciación y así confirmar la existencia de los residuos de cisteína en sus estructuras primarias.

Además se realizó una digestión del péptido B, utilizando dos endopeptidasas tales como Glu-C y Quimotripsina con la finalidad de conocer la conectividad entre los puentes disulfuro.

No se obtuvieron resultados que pudieran sugerir la conectividad entre los residuos de cisteínas, ya que la endopeptidasa Glu-C al parecer no funcionó del todo para este péptido. La cromatografía de los fragmentos obtenidos mediante HPLC dio lugar a diminutos picos, debido a la escasez de material crudo, lo cual impidió el análisis posterior de la secuencia de los fragmentos. La Quimotripsina dio igualmente, una serie de picos pequeños para el péptido B. Dos de ellos fueron los más grandes y prominentes; al momento de secuenciar los dos picos mayoritarios, del primero de ellos solamente fue posible obtener los 13 primeros aminoácidos resultado congruente con la especificidad de esta endopeptidasa (corte esperado en Y-20 y E-15), mientras que el segundo pico de igual forma dio los trece primeros aminoácido en su secuenciación. Al parecer la enzima no cortó el 100% de la muestra ya que el tiempo de retención que se tuvo para este péptido correspondió al mismo valor que cuando solamente fue repurificado después de la

reducción y alquilación; el hecho de obtener los trece primeros aminoácidos posiblemente se debió a la baja cantidad usada para la secuenciación.

- Purificación y caracterización de las toxinas de la especie *C. spurius*

El veneno crudo del caracol *C. spurius* fue obtenido por disección de un conducto venenoso. Este veneno fue fraccionado de igual forma por HPLC de fase reversa como se muestra en la figura 12 usando el protocolo preestablecido. Se separaron un gran número de péptidos mayoritarios del veneno. Del primero de ellos, indicado con la letra C en la figura 12, se determinó la secuencia de aminoácidos por el procedimiento estándar de degradación de Edman. El análisis dio 20 residuos de aminoácidos (tabla V), con 5 posibles residuos de cisteínas a lo largo de su estructura primaria con el siguiente arreglo (C-C-CC-C). El péptido fue analizado por espectrometría de masas (figura 13) y el ion molecular observado no fue congruente con la masa calculada a partir de la secuencia (tabla VI) debido a que este último valor es 1406.7 unidades menor al ion molecular.

A diferencia de los péptidos obtenidos para la especie *C. delessertii*, la secuencia parcial de este péptido se obtuvo del material sin repurificar, para evitar pérdidas del escaso material disponible. Por esta misma razón no fue posible hacer ningún otro estudio sobre este péptido.

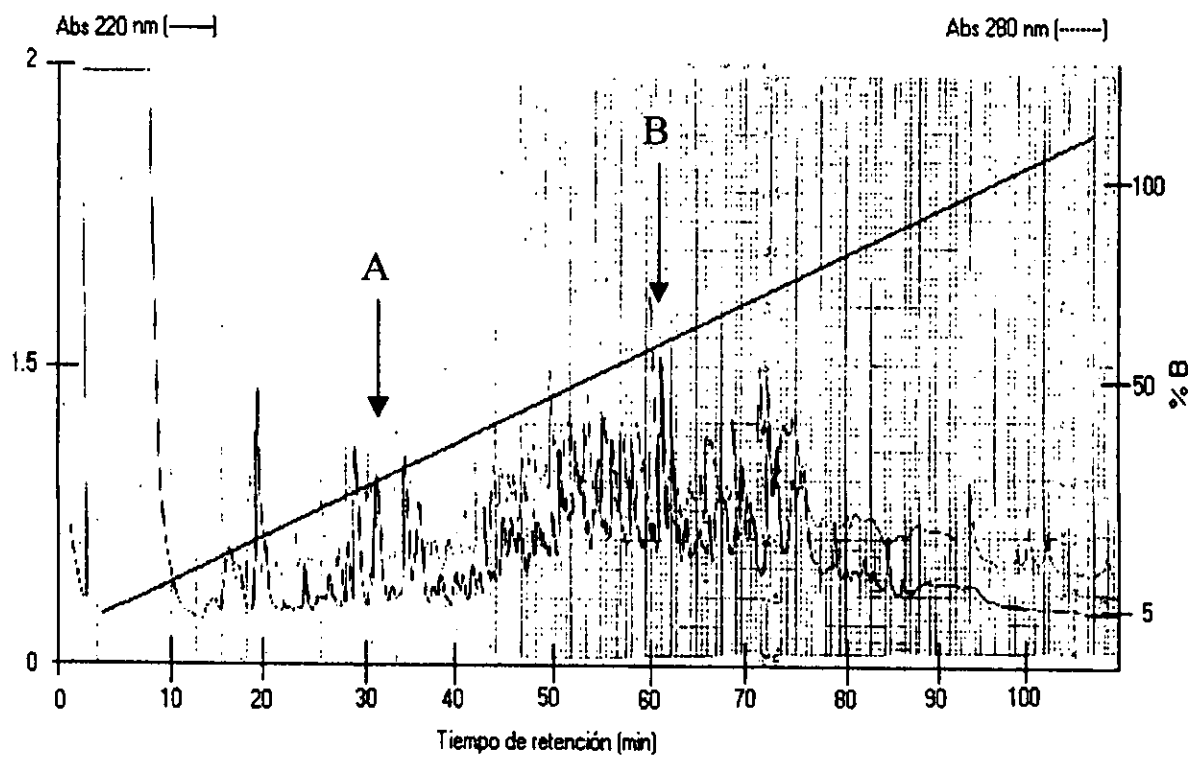


Figura 7. Cromatograma obtenido mediante HPLC de fase reversa del veneno de *C. delessertii*. Los péptidos fueron obtenidos utilizando un gradiente lineal de 1% de solución B por minuto. Las flechas A y B indican los péptidos que fueron estudiados.

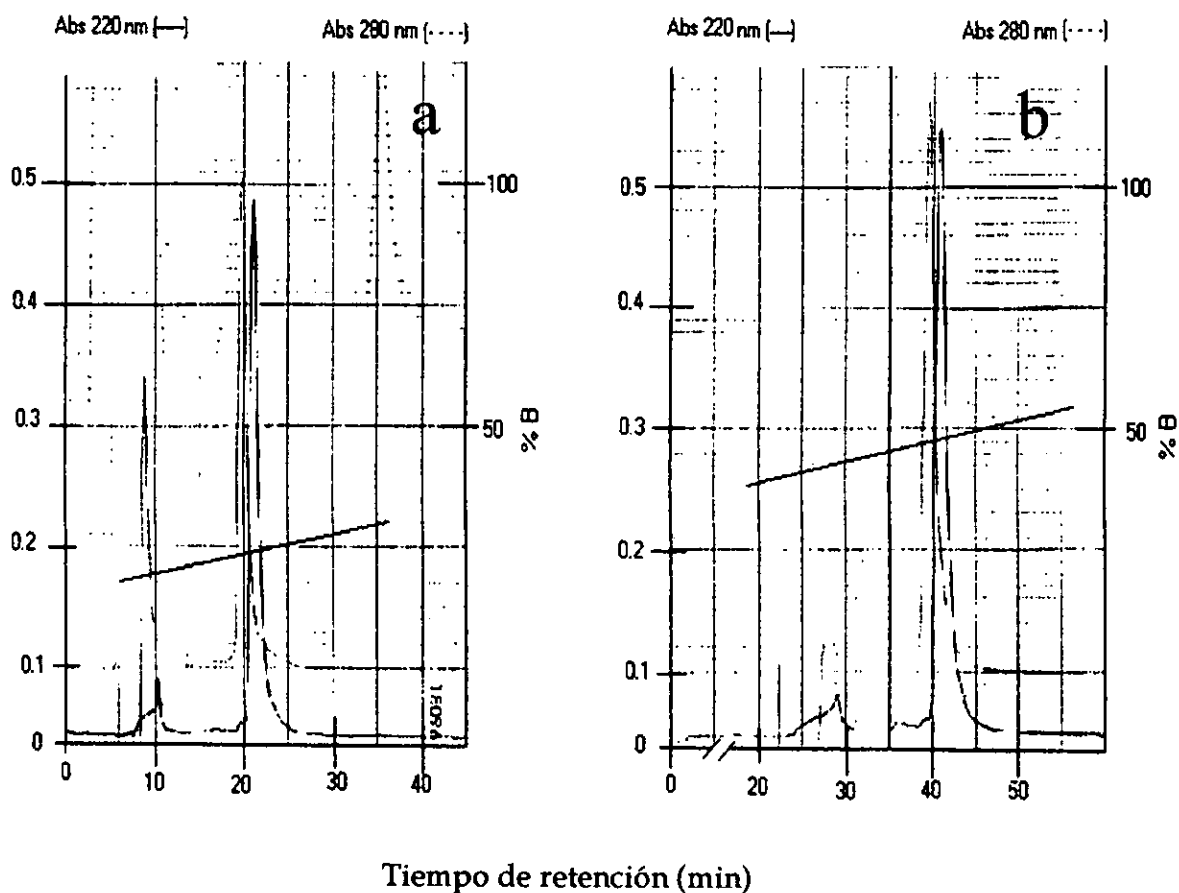


Figura 8. Cromatograma donde se muestra la repurificación de los péptidos A (a) y B (b) del extracto original. Los péptidos repurificados se obtuvieron utilizando un gradiente lineal de 1% de solución B por tres minutos.

Abs 269 (mU)

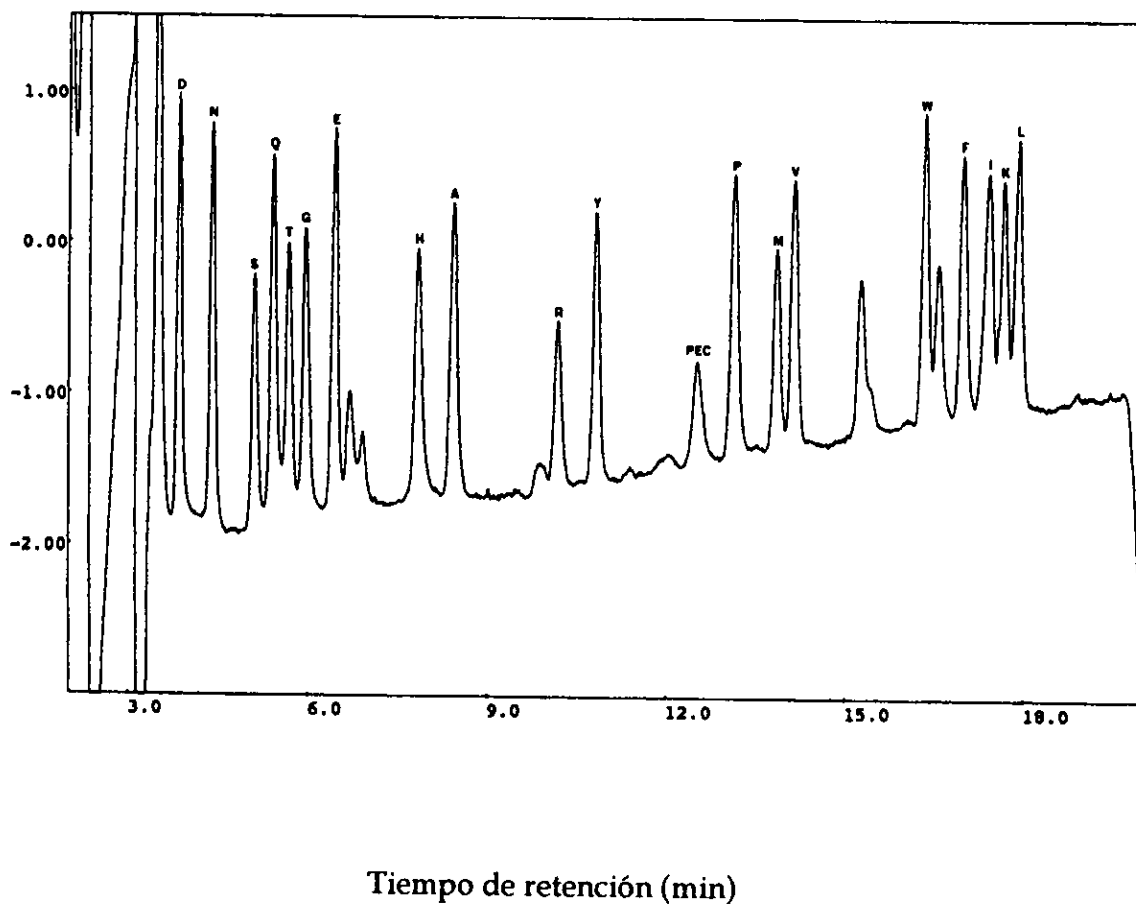


Figura 9. Cromatograma que se muestra los estándares de los feniltiohidantoin-aminoácidos (abreviatura de una letra), que sirvió para identificar cada uno de los residuos de aminoácidos en los péptidos aislados.

Tabla III. Secuencia de los péptidos extraído de *C. delessertii*

a) ACKOKNNLCAIT γ MA γ CCSGFCLYRC
b) DCOTSCOTT CANG(Kder)ECC(Kder)GYOCVN(Kder)ACSGCTHH

O= 4-trans-hidroxiprolina, Kder = hidroxilisina y γ = γ - carboxiglutamato.

Tabla IV. Masa molecular obtenida por espectrometría de masas y calculada matemáticamente.

Péptido	Valor por LDMS* (D)	Masa promedio calculada (D)
A	3091.2	3083.7
B	3494.1	3507.4

- Espectrometría de masas

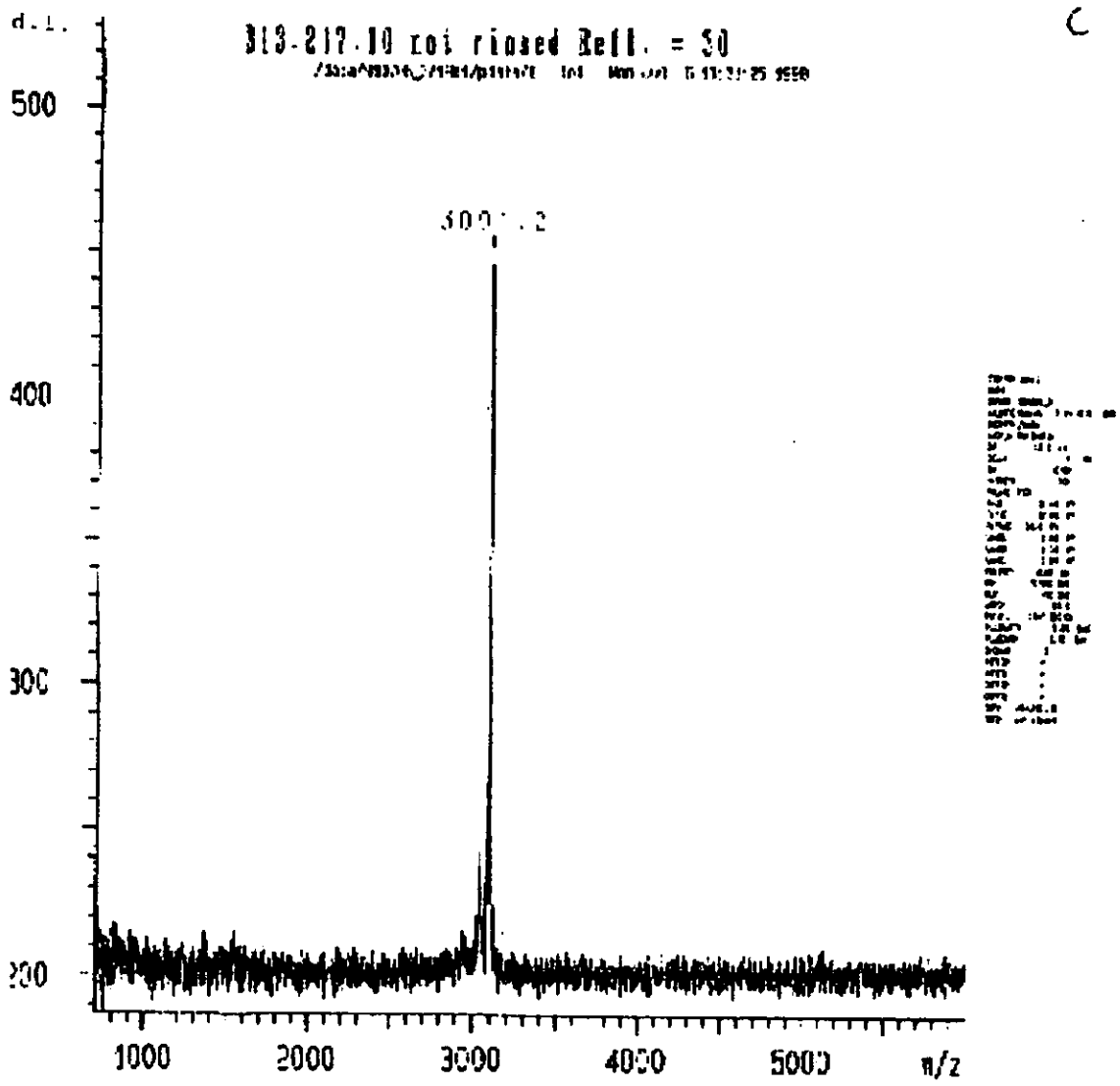


Figura 10. Resultado de la masa del péptido A, obtenida por espectrometría de masas

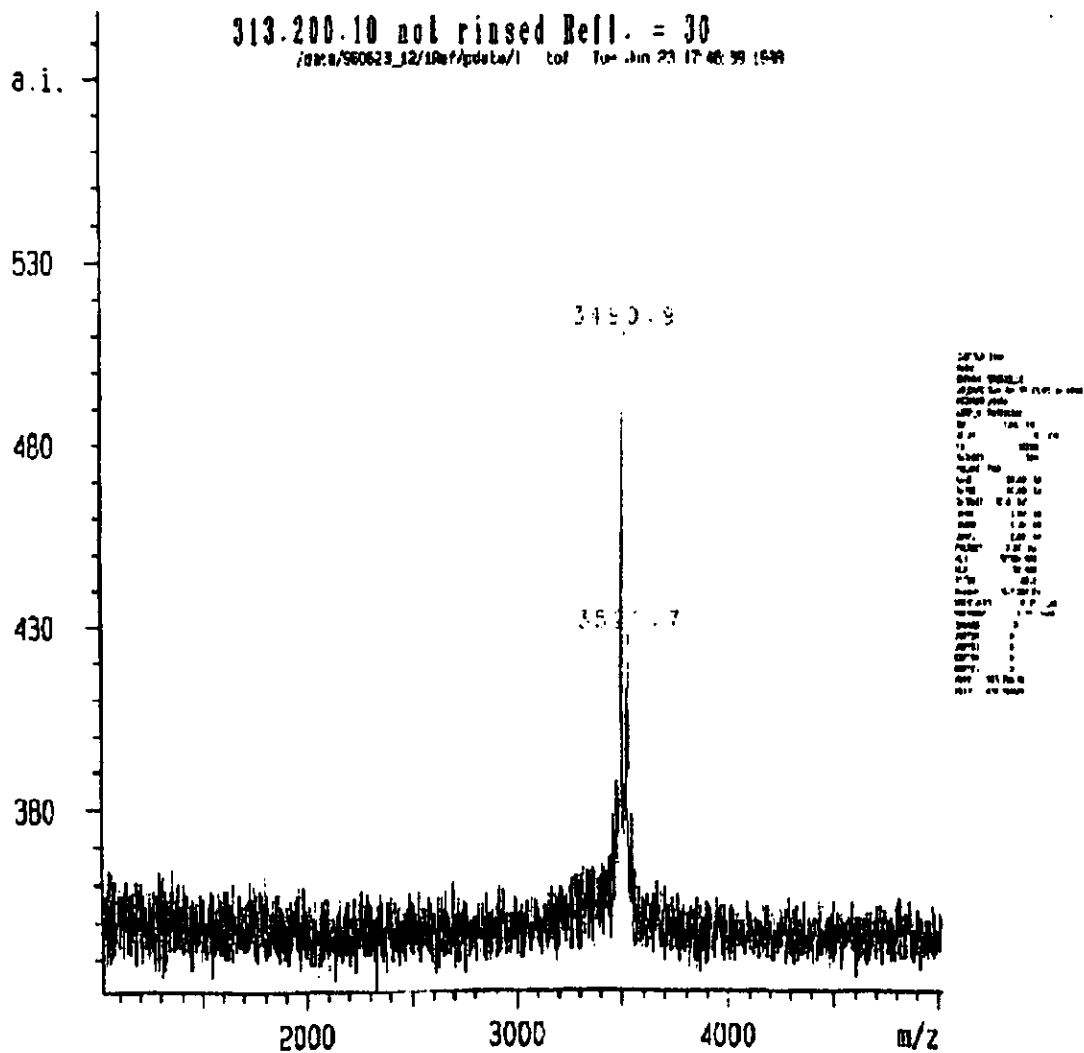


Figura 11. Resultado de la masa obtenida por espectrometría de masas para el pico B

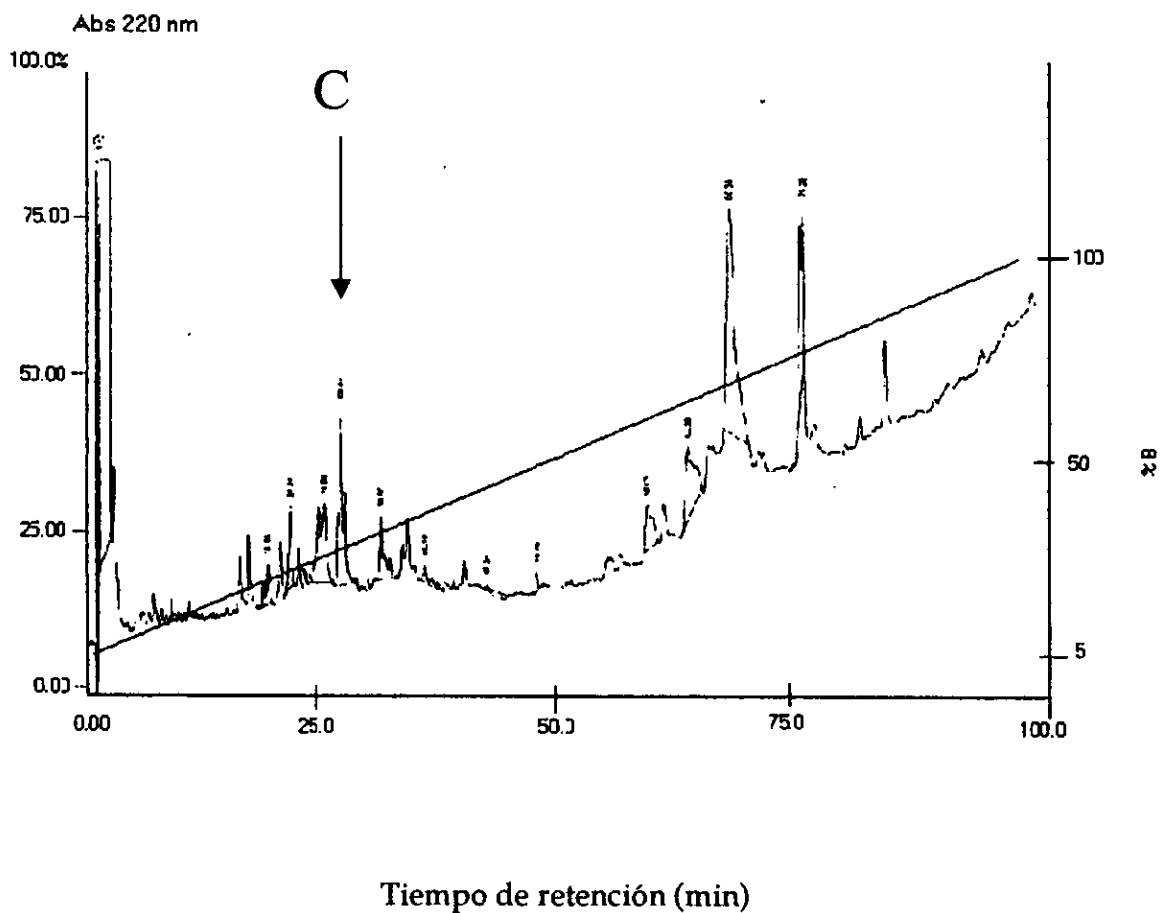


Figura 12. Cromatograma del extracto crudo de *C. spurius*, obtenido mediante HPLC de fase reversa. Los péptidos fueron fraccionados utilizando un gradiente lineal de 1% de solución B por minuto. El péptido C indicado con la flecha fue al que se le determinó su estructura primaria.

TABLA V. Secuencia del péptido purificado de *C. spurius*

CRTEGMSCTENNQCCRSSC*

* Secuencia parcial

TABLA VI. Masa molecular del péptido C de *C. spurius* por espectrometría de masas y calculada matemáticamente.

Valor por LDMS* (D)	Masa promedio calculada (D)
3647	2240.3

* espectrometría de masas

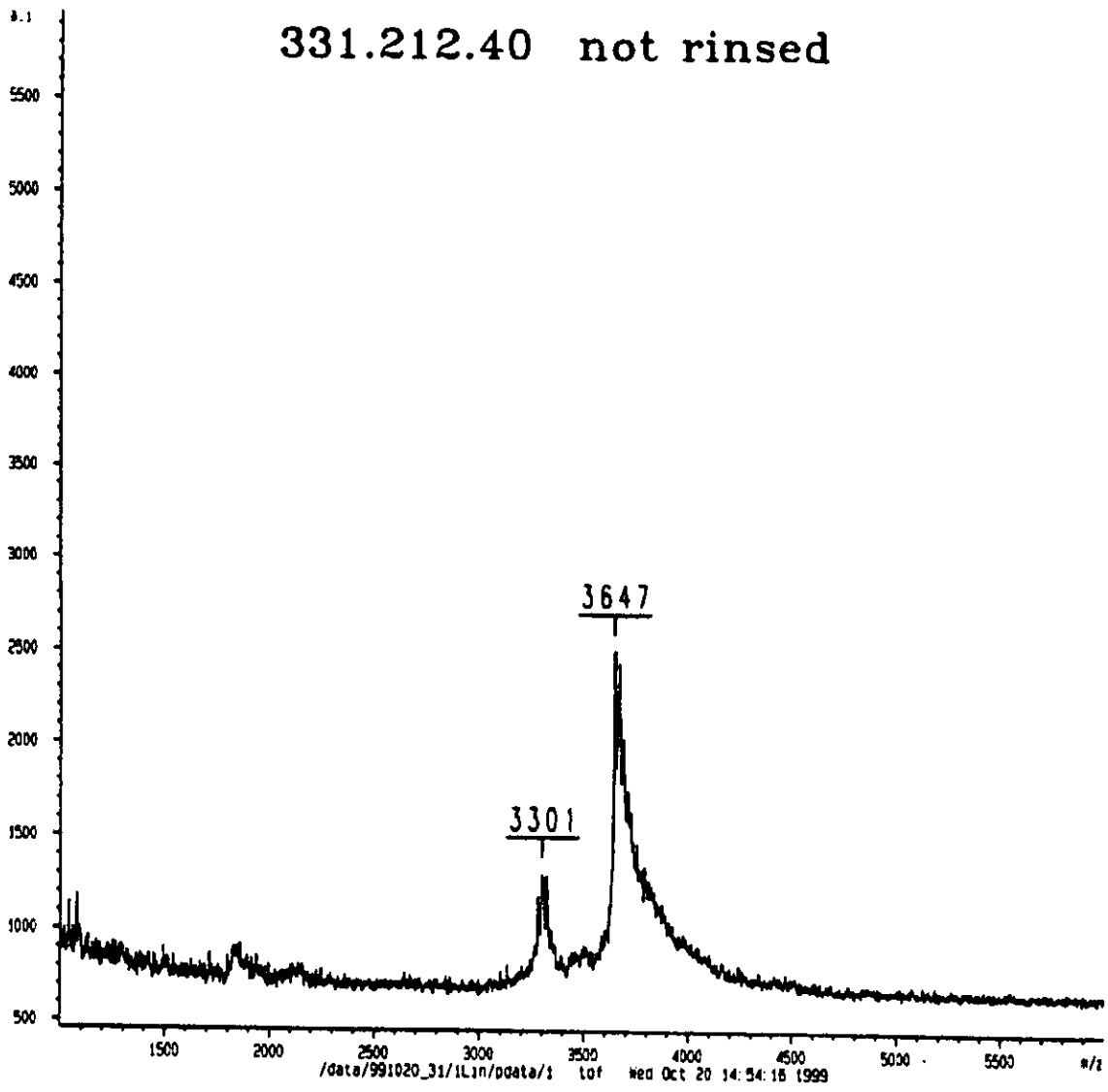


Figura 13. Resultado por espectrometría de masas del péptido de la especie *C. spurius*.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El veneno proveniente del caracol marino cazador de gusanos *Conus delessertii* contiene una variedad de péptidos de los cuales hemos aislado y purificado dos, en el presente trabajo, que hemos llamado A y B.

Los estudios de Olivera (1990) han demostrado que la mayoría de las conotoxinas contienen residuos de cisteína en una secuencia determinada, para cada una de las clases estructurales, a excepción de las conantoquinas. El péptido A de *C. delessertii* presenta 6 cisteínas en el orden C...C.....CC....C....C.

En la tabla VII, la secuencia del péptido A se comparó con toxinas de las clases estructurales ω , γ , y δ -conotoxinas aisladas de otras especies, dado que estas clases estructurales tiene el mismo patrón de cisteínas que dicho péptido.

Tabla VII. Comparación del péptido A con otras conotoxinas.

Toxina	Secuencia	Carga neta	Bibliografía
A	ACKOKNNL CAIT γ MA γ CC γ GF CLIR C	-3	
ω G VIA	CKSO GSS CSOTSYN CCR-S CNOYTKRCY	+5	Olivera 1984
ω M VIIA	CKGKGAK CSRLMYD CCTGS CRS GKC	+6	Olivera 1987
δ G _m VA	VKPCRKEGQL CDPIFQN CCRGWNCVLF CV	+2	Shon 1994
δ T _x VIA	W CKQSGEM CNLLDQN CCDGY CIVLV CT	-2	Hillyard 1989
γ T _x VIIA	CGGYSTY C γ VDS γ CCSDN CVRSY CTLF	-5	Fainzilber 1998
γ P _n VIIA	D CTSWFGR CTVNS γ CCSNS CDQTY C γ LYAFOS	-5	Fainzilber 1996

De esta comparación surgen las siguientes características :

- (1) Los residuos de cisteínas siguen la misma secuencia en todas las clases estructurales mostradas, con pequeñas variaciones en el tamaño de las asas, debido al número de residuos de aminoácidos intercisteínas.
- (2) Hay una gran variedad de los aminoácidos en casi todas las posiciones entre los residuos de cisteínas.
- (3) Las ω -conotoxinas son hidrofílicas y con predominancia de una carga positiva neta, mientras que tanto las γ -conotoxinas como las δ -conotoxinas son hidrofóbicas y con una pequeña carga negativa neta.

El péptido A comparte características de estas tres clases estructurales ω , δ y γ conotoxinas, pero presenta dos derivados del aminoácido γ -carboxiglutamato, característica que sólo presentan las γ -conotoxinas.

Por esta razón se puede decir que este péptido pertenece a la clase estructural de las γ -conotoxinas, que juegan un papel importante como agonistas de las corrientes catiónicas tipo marcapaso (Fainzilber et al., 1998).

Se ha demostrado que la conectividad entre los residuos de cisteínas es la misma para las clases estructurales ω , γ y δ (I-IV, II-V y III-VI). Respecto a la conectividad entre los residuos de cisteínas para el péptido A, esto no pudo determinarse mediante el uso de enzimas proteolíticas, debido al poco material disponible, posterior a los estudios de repurificación, espectrometría de masas, así como el material utilizado para secuenciación; en este último tipo de estudio se ocupó material tanto puro como después de reducir y alquilar. No obstante el poco

material sirvió para determinar la secuencia completa de este péptido (ver más adelante). Sin embargo se sabe que las diversas conotoxinas son sintetizadas a partir de un polipéptido precursor de gran tamaño y Woodward (1990) reporta la existencia de una alta homología en el precursor para las δ -conotoxinas y ω -conotoxinas. Se ha sugerido que en la región pro del precursor está la secuencia que modula el plegamiento específico de la molécula y las conexiones entre los residuos de cisteínas, para formar la toxina madura (Woodward et al., 1990) . Aunque el precursor de este péptido no ha sido determinado, podemos predecir que las uniones entre los puentes disulfuro serán similares a las de las ω , γ y δ -conotoxinas.

Para corroborar la secuencia del péptido A, éste fue sometido a análisis por espectrometría de masas, obteniéndose un ion molecular de 3091.2 D. Este peso molecular es 7.5 D mayor que el determinado por cálculos matemáticos a partir de la secuencia obtenida.

Este resultado valida la presencia de dos residuos de γ -carboxiglutamato en el péptido, cuya identidad no quedaba absolutamente clara en la secuenciación. Durante la secuenciación, en los pasos 13 y 16 no hubo incremento apreciable correspondiente a ningún otro aminoácido (excepto E). Esta misma observación se ha hecho en otros conopéptidos cuyas secuencias presentan residuos de γ -carboxiglutamato, quedando así confirmada la secuencia propuesta para A.

Es por esto que propongo que el péptido A es una γ -conotoxina, su estructura primaria está totalmente determinada y corresponde a la siguiente secuencia ACKOKNNLCAIT γ MA γ CCSGFCLYRC quedando ahora denominado como DeVIIA siguiendo la nomenclatura propuesta por Gray y Olivera (1988).

El péptido B fue procesado de igual forma que el péptido A. La determinación de su secuencia permitió hacer una asignación de la siguiente estructura primaria :

1.....5.....10.....15.....20.....25.....30.....
DCOTSCOTTCANG(Kder)ECC(Kder)GYOCVN(Kder)ACSGCTHH

La asignación de los residuos derivados de lisinas en las posiciones 14, 18 y 25 de la secuencia se hizo con base a que en los pasos correspondientes a estas posiciones durante la secuenciación, se observó un pico que no correspondía a ninguno de los aminoácidos naturales, ni a ninguna de sus modificaciones usuales, presentes en las conotoxinas (hidroxiprolinas, γ -carboxiglutamato).

Para determinar la estructura química de estos tres residuos se procedió al análisis por espectrometría de masas del péptido, obteniéndose un ion molecular de 3494.1 D. Este ion excede en 44.7 D al ion que se derivaría si los residuos 14, 18 y 25 fuesen lisinas (3449.4 D determinado matemáticamente), lo que sugiere la posible hidroxilación del residuo lisina en estas tres posiciones.

El ion molecular obtenido para el péptido B (3494.1D) es tan sólo 13.3D menor que el calculado matemáticamente al considerar a los residuos de lisina hidroxilados (3507.4 D). Recientemente, en el laboratorio del Dr. Olivera, se ha preparado el derivado hidroxilado de lisina, y su tiempo de retención en las condiciones de secuenciación es igual con el observado en los picos correspondientes 14, 18 y 25 de nuestra secuenciación. Es la primera vez que este tipo de modificación se detecta en conotoxinas, y su presencia aumenta la lista de residuos modificados en estos compuestos.

El péptido B es muy novedoso, no sólo por presentar residuos de derivados de lisina, sino además por presentar 8 residuos del aminoácido cisteína. La distribución de éstos a lo largo de la cadena peptídica es parecida a la de las ω , δ y γ -conotoxinas, pero su conectividad no está determinada. En todo caso, de estar involucrados los 8 residuos de cisteínas en la formación de 4 puentes disulfuro, podría considerarse al péptido como el primero de una nueva clase estructural de conotoxinas (ϵ -conotoxinas).

Pese a que existen diferencias en los pesos moleculares calculados matemáticamente con los obtenidos por espectrometría de masas para ambos péptidos (A y B) , se reitera que la estructura primaria para ambos péptidos está completa, debido a la certidumbre de los PTH-aminoácidos al momento de secuenciar; la diferencia posiblemente se deba a una mala equilibración del equipo (espectrómetro de masas). También cabe mencionar que los estudios realizados para los péptidos A y B fueron hechos en la Universidad de Utah, EUA, durante mi estancia de investigación, bajo la asesoría del Dr. Baldomero Olivera.

Posterior al regreso de la estancia se iniciaron los estudios en México, realizándose los primeros ensayos con la especie *C. spurius* como se menciona a continuación.

El fraccionamiento del veneno crudo para la especie *C. spurius* se realizó con un solo conducto venenoso ya que no había más especímenes disponibles. El veneno de esta especie es extremadamente complejo, estando constituido por un gran número de péptidos como se puede observar en la figura 12. Debido a la poca cantidad de veneno fraccionado, sólo fue analizada una toxina y su estructura primaria fue la siguiente :

1.....5..... 10.....15.....20
CRTEGMSCTENNQQCCRSSC

Al comparar el peso molecular determinado matemáticamente (2240.3 D) de la secuencia hasta ahora obtenida, con el proveniente del análisis por LDMS (3647.0 D), se determina que esta secuencia es parcial y faltaría obtener la identidad de aproximadamente 12 aminoácidos.

Este péptido podría entrar dentro de la clase farmacológica de las ω -conotoxinas las cuales bloquean canales de calcio presinápticos o de las δ -conotoxinas que agonizan canales de sodio ya que presenta hasta ahora 5 posibles residuos de cisteína.

Dentro de las estrategias que se tienen contempladas para completar la secuencia de este último péptido, está la obtención de un mayor número de ejemplares de esta especie (alrededor de 5), con la finalidad de obtener una mayor muestra correspondiente al mismo valor de tiempo de retención que se obtuvo para éste; posteriormente se realizarán estudios de reducción y alquilación, de digestión con endopeptidasas tales como la elastasa y la tripsina, por su gran afinidad de hidrolizar residuos de aminoácidos neutros (Serina) y básicos (Arginina), respectivamente; también sería útil hacer estudios de cuantificación de aminoácidos.

Por otro lado también se tiene contemplado dentro de las estrategias, establecer bioensayos de tipo electrofisiológico (con la finalidad de evaluar nuestros conopéptidos) en neuronas aisladas del caracol de jardín *Helix aspersa*, dado que en este modelo se tiene muy bien caracterizado tanto las neuronas que se disecan así como el tipo de receptores y/o canales iónicos que presentan (Akaike et al., 1978, Standen 1981, Kerkut et al., 1975).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- Abbot R. T. (1974). American Seashells. The Marine Mollusca of the Atlantic and Pacific Coast of North America. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 2 Ed., 666p.
- Akaike N., Lee K. S. y Brown A. M. (1978). The calcium current of *Helix* neuron. J. Gen. Physiol. 71: 509-531.
- Burnett J.W. (1990). In: Marine toxins origin, structure and molecular pharmacology. American Chemical Society. p.p. 333-335.
- Burnett J.W., Kumar S., Malecki J.M. y Szmant A.M. (1995). The antibody response in seabather's eruption Toxicol 33:99-10.
- Cotton J., Crest M., Bouet F., Alessandri N., Gola M., Forest E., Karlsson E., Castaneda O., Harvey A.L., Vita C. y A Mendez (1997). A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, and inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide -bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. Eur. J. Biochem. 244: 192-202.
- Cruz, L.J., Gray, W. R., Olivera, B.M., Zeiukus, R. D., Kerr, L., Yoshikami, D. y E. Moczydlowski (1985). *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. J. Biol Chem 260 :9280-9288.
- Cruz, L., de Santos, V., Zafaralla, G. C., Ramilo, C. A., Zeiukus, R., Gray, W. R y B. M Olivera (1987). Invertebrate vasopressine/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus striatus* venoms. J. Biol. Chem. 262 :15821-15824.

Cruz L.J. (1989): Conotoxins biochemical probes for ion channels and receptors. In: Natural toxins characterization , pharmacology and therapeutics. Pergamon Press 66:75.

Cruz L.J. (1990). Conotoxins: Targeted peptide ligands from snail venoms, In: Marine toxins origin structure and molecular pharmacology American Chemical Society. Washington, D.C. 256-278.

de Vries D.J. y Beart P.M. (1995): Fishing for drugs from the sea: status and strategies. TIPS 16:273-279.

Dauplais M., Lecoq A., Song J., Cotton J., Jamin N., Gilqui B., Roumestand C., Vita C., de Madeiros C.L.C., Rowan E.G., Harvey A.L. and Menez A. (1997). On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. J. Eur. Chem. 272: 4302-4309.

Dubois J.M., Tanguy J. y Burnett J.W. (1983). Ionic channels induced by sea nettle toxin in the nodal membrane Biophys. J. 42:199-202.

Fainzilber, M., Nakamura, T., Lodder, J. C., Zlotkin, E., Kits, K. S. y Burlingame, A. L. (1998). γ -Conotoxin-PnVIIA, A γ -Carboxyglutamate-Containing Peptide Agonist of Neuronal Pacemaker Cation Currents. *Biochem.* 37: 1470-1477.

Faizilber M., Lodder J. C. Van der Schors R., Yu Z., Burlingame A. L., Geraerts W. P.M. y Kits K. S. (1996). A novel hydrophobic ω -conotoxin blocks molluscan dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Biochem.* #5:8748-8752.

Gray, W.R., Luque, F. A., Olivera, B.M., Barret, J. y Cruz, L.(1981). Peptide toxins from *Conus geographus* venom J. Biol. Chem., 23 :4734-4740.

Gray, W. R., Luque, F. A. y R Galyean (1984). conotoxins GI : disulfide bridges, synthesis and preparation of iodinated derivates. *Biochemistry* 23 :2796-2802.

Gray W.R., Olivera B.M. y Cruz L.J. (1988). Peptides toxins from venenous *Conus* snails. *Ann. Rev. Biochem.* 57:665-700.

Haack, J. A., Rivier, J., Parks, T. N., Mena, E. E., Cruz, L. J. y Olivera, B. M. (1990). Conantokin-T. A γ -carboxyglutamate containing peptide with N-methyl-D-aspartate antagonist activity. *J. Biol. Chem.*, 265: 6025-6029.

Hillyard, D. R., Olivera, B. M., Woodward, S., Corpuz, G. P., Gray, W. R., Ramilo, C. A. y Cruz, L. J. (1989). A Molluscivorous *Conus* Toxin: Conserved Frameworks in Conotoxins. *Biochem.*, 28: 358-361.

Hammerland L.J., Olivera B.M. y Yoshikami D. (1992). Conantokina-G selectively inhibits N-methyl-D-aspartate-induced currents in *Xenopus* oocytes injected with mouse brain mRNA. *Eur. J. Pharm.* 226: 239-244.

Kem W. R., Penninton M.W. y Dunn B. M. (1990). Sea anemone polypeptide toxins affecting sodium channels. In: *Marine toxins origin structure and molecular pharmacology*. American chemical Society Washington D. C. 279.

Kerkut G. A. y Garnner (1975). Mapping of nerve cells in the subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp Biochem, Physiol.* Vol 50-A, 1-28.

Kohn, A. J.(1976). Chronological analysis of the species of *Conus* describe during the 18 century. *Zool. J. Linn. Soc. Lond.* 58 :39-59.

Konig G.M. y Wright A.D.(1996). Marine natural products research; current directions and future potential. *Planta Med.* 63:193-211.

Lin, C. H., Chen, C. S., Hsu, K. S., King, D. S. y Lyu, P. C. (1997). Role of modified glutamic acid in the helical structure of conantokin-T. *FEBS Letters*, 407: 243-248.

Martinez, J. S., Olivera, B. M., Gray, W. R., Craig, A. G., Groebe, D. R., Abramson, S. N. y McIntosh, J. M. (1995). α -conotoxin EI, a new nicotinic acetylcholine receptor antagonist with novel selectivity. *Biochem.*, 34: 14519-14526.

McIntosh, J. M, Cruz, L.J., Hunkapiller, M.W., Gray, W.R. y Olivera, B. M(1982). Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus* Arch. *Biochem.Biophys.* 218,239.

McIntosh, J. M., Olivera, B. M., Cruz, I. J. y R. W Gray (1984) γ -carboxyglutamate in neuroactive toxin. *J. Biol. Chem.* 259 :14943-14946.

Myers R.A., CruzL.J., Rivier J.E. y Olivera B.M. (1993). *Conus* peptides as chemical probes for receptors and ion channel. *Chem. Rev.* 93:1923-1936.

Nakamura, H., Kobayashi, J., Ohizumi, Y. y Y Hirata (1983). Isolation and amino acid composition of geographustoxin I and II from the marine snail *Conus geographus* Linné. *Experientia* 39 :590-591.

Olivera B. M., McIntosh, J. M., Cruz, L.J., Luque, F. A. y W. R Gray (1984). Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* 23 :5087-5090.

Olivera, B. M., Gray, W. R., Zeikus, R., McIntosh, J. M., Varga, J., Rivier, J., de Santos, N. y L. J Cruz (1985). Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 230 :1338-1343.

Olivera, B. M., Cruz, L.J. y de Santos, V. (1987). Neuronal Ca channel antagonists. Discrimination between Ca channel subtypes using ω -conotoxins from *Conus magus* venom. *Biochemistry* 26 :2086-2090.

Olivera B.M., Hillyard D.R., Rivier J., Woodward S., Gray W.R., Corpuz G. y Cruz L.J. (1990). Conotoxins: Targeted peptide ligands from snail venoms, in: *Marine toxins origin structure and molecular pharmacology* American Chemical Society. Washington, D.C. 256-278.

Olivera B.M., Milijanich G.P., Ramachandran J. and Adans M.E. (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Ann. Rev. Biochem.* 63:823-867.

Olivera B.M., Hillyard D.R., Marsh M. y Yoshikami D. (1995). Combinatorial peptide libraries in drug design: lessons from venomous cone snail. *Trends. Biotechnol.* 13:422-426.

Olivera B M. (1996). *Conus* Venom Peptides, Receptor and Ion Channel targets, and Drug design: 50 Million years of Neuropharmacology. *Mol. Biol Cell.* 8:2101-2109

Othman Y. y Burnett J.W. (1990). Techniques applicable for purifying *Chironex fleckeri* (box-jellyfish) venom *Toxicon* 28:821-835

Ramilo, C A., Zafaralla, G. C., Nadasdi (1992). Novel α - and ω -conotoxins from *Conus striatus* venom. *Biochemistry* 31 :9919-9926.

Ridwan B.H., Kaswandi M.A., Azman Y. and Fuad M. (1995). Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. *Gen Pharmacol.* 26:1539-1543.

Röckel, D., Korn, W. and A J Kohn (1995). Manual of the living Conidae. Wiesbaden Verlag Christa Hemmen 5-13.

Rottini G., Gusmani L., Parovel E, Avian M. Y Patriarca P. (1995). Purification and properties of the jellyfish *Caribdea marsupialis* *Toxicon* 33:315-326

Sato S., Nakamura H., Ohizumi Y., Kobayashi J. y Hirata Y. (1983). The amino acid sequence of homologous hydroxyproline containing myototoxins from the marine snail *Conus geographus* venom. *FEBS Lett.* 155:277-280.

Shon K.J., Hasson A., Spira M.E., Cruz L.J., Gray W.R. y Olivera B.M. (1994). δ -conotoxin GmVIA, a novel peptide from the venom of *Conus gloriamaris* *Biochem.* 33: 11420- 11425.

Shon, K., Grilley, m. M., Marsh, M., Yoshikami, D., Hall, A.R., KurzB., Gray, W. R., Imperial, J. S., Hillyard, D. R., y B. M Olivera (1995). Purification, characterization and cloning of the lockjaw peptide from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 34 :4913-4918.

Shon, K., Koerber, S. C., Rivier, J. E., Olivera, B. M y J. M McIntosh (1997). Three-dimensional solution structure of α -conotoxin MII and α 3 β 2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor-targeted ligan. *Biochemistry.* 36:15693-700.

Spence, I., Gillessen, D., Gregson, R. P. y R J Quinn (1977). Characterization of the neurotoxic constituents of *Conus geographus* (L) venom. *Life Sci* 21 :1759-1770.

Standen N. B (1981). Ca Channel inactivation by intracellular Ca injection into *Helix* neurons. Nature. Vol. 293: 253-368.

Terlau H., Shon K-J., Grilley M., Stocker M., Stuhmer W. y Olivera B.M. (1996). Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. Nature. Vol. 381: 148-151.

Woodward S R, Cruz L J., Olivera B. M. y Hillyard D. R. (1990). Constant and hypervariable regions in conotoxins propeptides. EMBO J. 1: 1015-1020.